



TITLE:

自由13 法医鑑識領域における各種  
試料の人獣鑑別に関する研究: 霊長  
類とヒトの血液の鑑別を中心とし  
て(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

玉木, 敬二; 佐藤, 啓造; 勝又, 義直; 山本, 敏充; 堤, 肇

---

CITATION:

玉木, 敬二 ...[et al]. 自由13 法医鑑識領域における各種試料の人獣鑑別に関する研究: 霊長  
類とヒトの血液の鑑別を中心として(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報  
1991, 21: 82-83

ISSUE DATE:

1991-09-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164218>

RIGHT:

アフリカミドリザルやスーティマンガベイなどから HIV (Human Immunodeficiency Virus) 類似の SIV が分離されており、エイズ感染モデルとして注目されている。ニホンザルでは STLV-1 の感染が知られているが、血清抗体の調査では SIV 感染の例はほとんど知られていない。本研究では免疫担当細胞の一つのサブセット、CD8 陽性細胞 (サブプレッサー/細胞障害性 T 細胞) を人為的に取り除くことによって、SIV 感染細胞に対する免疫監視を不活化し、ニホンザルにおける SIV 感染を検討した。

霊長類研究所のニホンザル 30 頭から採血を行った。血清を PBS で 10 倍希釈し、STLV-1 陽性 MT1 細胞スマアおよび SVI mac251 陽性 Hut78 細胞スマアを用いて間接蛍光抗体法で血清抗体価を測定した。その結果、16 頭 (53%) が STLV-1 抗体陽性であった。一方、全頭が SIV 抗体陰性であった。

ニホンザル CD8 抗体 (U2) と補体処理で CD8 細胞を取り除く方法、あるいは CD4 抗体を用いた FACS ソートまたは間接パンニング法で CD4 細胞を濃縮した。分離後、5  $\mu$ g/ml の ConA と 100U/ml の IL2 を含む 15% FCS-RPMI1640 培地で培養を開始した。培養後、1 週間以内には STLV-1 由来と思われる小 CPE 形成が数頭のニホンザルで観察された。培養 20 日目以降、5 頭に SIV 感染細胞にみられるような巨大 CPE 細胞が出現し、やがて細胞は死滅した。CPE を形成した時点の細胞を用いてアセトン固定スマアを作製し、SIV mac251 接種アカゲザルの SIV 抗体陽性血清を用いて、間接蛍光法で SIV 抗原を検索した。その結果、これら 5 頭は SIV 抗原陽性である事が判明した。

今後ニホンザルにおける SIV 感染をウェスタンブロット法などで検討し、確証を得ると共に野生ニホンザルの SIV 感染も検討したい。

#### 自由12:

精巣に特異的な塩基性タンパク値の比較生化学的検討

大原生子 (近畿大・医)

ラット成獣の精巣中にある塩基性タンパクのうち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE と略す) で分子量が 4K に相当する

位置に泳動されるタンパク (4K タンパクと略す) が、ブタ、サル、サルの精巣にも存在し、これが精子形成に関与するタンパクである事を、前年度に報告した。今回は、1) 4K タンパクの発現する時機、2) サルにおける季節及び加齢による動態について報告する。精子形成の未熟な生後 15 日のブタの精巣 (ライディッヒ細胞、セルトリ細胞精祖細胞からなる) 及び精祖細胞から精母細胞への分化系に異常のある不妊ラットの精巣からは、SDS-PAGE で 4K を示すタンパクのバンドはえられなかった。発現量が微量のため、SDS-PAGE では検出出来ないのか、あるいは精子形成の初期には必要のないタンパクか、これまでのところ不明である。季節繁殖性を示すニホンザルで、繁殖期 (9 月) 及び非繁殖期 (5 月)、と加齢による 4K タンパクの動態を調べた。6 才令の繁殖期、非繁殖期の精巣中の 4K タンパクは、SDS-PAGE で、タンパク量あたりのバンドの濃淡が、後者に比して前者では強いバンドを示した。一方 2 才令の繁殖期の 4K タンパクのバンドは、拡散しておりバンドとしてみとめられなかった。更に正確な情報をえるために、分子レベルでの検討を加えた。既にラット精巣でえられている 4K タンパクのアミノ酸配列より予想される DNA 配列から、18mer のオリゴヌクレオチドを DNA 合成機にて合成し、これに<sup>32</sup>S 及びビオチンラベルし、これをプローブとして in situ-Hybridization 法にて 4K タンパク-mRNA の局在を検討した。ラットでは精子形成開始前の 3.5 週前からポジティブな像がえられた。サルの加齢、季節による変化については、検討中である。更に発現機構を詳細に知るために 4K タンパク遺伝子のクローニングを計画し、抗体作製及び cDNA-ライブラリーの作製を試みている。

#### 自由13:

法医鑑識領域における各種試料の人獣鑑別に關する研究—霊長類とヒトの血液の鑑別を中心として—

玉木敬二・佐藤啓造・勝又義直 (名大・医)

山本敏充・堤 肇 (愛知県警・科捜研)

法医鑑識領域における血痕や尿斑等の人獣鑑別は重要な検査の一つであり、酵素免疫測定法の応用などにより多くの成果が得られているが、その

ほとんどがタンパク質を検出するものであるために、ある程度時間のたった斑痕などではタンパク質の変性は避けられず、同法の使用は制限されてしまう。近年になって、タンパク質よりも安定なDNAを利用した物体検査法が多く開発されるようになった。DNAは有核細胞ならば必ず存在するため、血液だけでなく各種体細胞や毛髪からでも抽出できるので、法医物体検査において大変有用な生物材料となる。今回、我々はヒトゲノムDNA中に広く分布する*Alu*配列を組み込んだBLUR8プラスミドをプローブとして用い、検体のDNAとドットハイブリダイゼーションを行ない判定する方法の有用性について、数種の霊長類のDNAにより検討した。

<sup>32</sup>P標識プローブを用いた方法ではヒトのゲノムDNA量が0.5ng（全血にして0.02  $\mu$ l）以上スポットされていれば明確な反応が認められたが、霊長類のDNAも交差反応を示した。すなわち、類人猿2種と旧世界ザル5種ではヒトと同等の強さの反応を示したほか、1ng以上のDNAをスポットした場合、新世界ザル3種では弱い交差反応が認められ、原猿類2種でも極めて弱いながら交差反応が認められた。ラットのDNA 20ngスポットしてもまったく反応は認められなかった。非放射性プローブと化学発光を用いた方法では、検出感度の若干の低下がみられたが、交差反応については同様の傾向であった。

このように、*Alu*配列を用いた人獣鑑別法はヒトと霊長類以外の下等な動物との鑑別には有効であることが示されたが、原猿類以上では*Alu*様配列との交差反応が現れるようになり、特に旧世界ザル以上の種では鑑別がきわめて困難であることが示された。

#### 自由14：

霊長類の筋肉プロテアーゼの機能に関する研究

川島誠一（東京都老人研）

霊長類の筋機能におけるプロテアーゼの役割を探るため、まずサル骨格筋からカルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）の大量精製を試みた。日本ザルの上下肢筋肉の粗抽出液を調製し、DEAE-セルロース・ウルトロゲル・フェニルセファロースなどの担体を用いたクロマトグラ

フィーにより、カルシウム感受性の異なる2種類のCANP（ $\mu$ CANPとmCANP）を精製した。いずれのCANPも、ウサギ骨格筋から精製したCANPと同様に、80Kサブユニットと30Kサブユニットから成り、ウサギCANPと分子量は差はなかった。サルmCANP活性のカルシウム感受性はウサギmCANPとほぼ同じであったが、サル $\mu$ CANPの感受性はウサギ $\mu$ CANPより低かった。また、サル骨格筋はウサギ骨格筋に比べ $\mu$ CANPの割合が大きいことも顕著な差であった。

#### 自由15：

霊長類の臭気およびその成分の個体識別機能の分析に関する研究

二木安之（信州大）

ニホンザル、フサオマキザル、ツバイ、カニクイザル、チンパンジー、リスザル、ワオキツネザルの繁殖コロニー、放飼実験場、育成舎、飼育室における臭気とその成分の対応と動物に特有な「においのコミュニケーション」を解析することを目的として、霊長類研究所においてフィールド調査を嗅覚官能試験とガスクロマトおよびイオンクロマトで機器分析した。その結果、フサオマキザルは軽いムスク様を有する動物様、ツバイは明りょうな焦げ臭様、チンパンジーは明りょうな脂様で、臭気強度は6段階臭気強度表示法で2.00～3.33（5人のパネルの平均値）、中程度の強度であった。また、におい腺を用いたにおい行動でなく尿をにおい源とした特徴的行動（Urine-washing；Urine-rubbing）が認められるフサオマキザルの尿成分を特に詳しく分析した結果、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $(\text{COO}^-)_n$ 、尿酸、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ には性差が認められた。 $\text{Cl}^-$ は、ヒト尿より低値であった。3週間放置したバー（塩ビ製、110×4cm外径表面に凹凸をつけてあるものから綿棒で少量のイオン交換蒸留水でふきとったものをイオン交換蒸留水にサスペンションした）のサンプルからは、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ の消失が認められたが $\text{SO}_4^{2-}$ は、ほとんど変化しなかった。さらに、フサオマキザル尿中 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 比は、1以下でこれは一年未満のヒト小児に相当することが明らかになった。